

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 15, 1977, pp. 465–472

Die Messung von freiem Cortisol, freiem Testosteron und freiem Östradiol-17 β ; Vergleich fünf verschiedener Methoden¹⁾

Von H. K. Kley, E. Bartmann²⁾ und H. L. Krüskemper

2. Medizinische Klinik und Poliklinik der Universität Düsseldorf

(Eingegangen am 2. Februar/5. Mai 1977)

Zusammenfassung: Um Kriterien für die Beurteilung verschiedener Verfahren zur Messung von freiem Cortisol, freiem Testosteron und freiem Östradiol-17 β im Plasma bei 37 °C zu erhalten, wurden 5 verschiedene Methoden miteinander verglichen: Gleichgewichtsdialyse mit nicht verdünntem Plasma, Gleichgewichtsdialyse mit 1:5 verdünntem Plasma (Korrelation $r:0,95$), Gleichgewichtsdialyse mit graphischer Auswertung ($r:0,90$), zonale Chromatographie ($r:0,92$) und zentrifugale Filtration ($r:0,80$). Dazu wurden die freien Steroidfraktionen der drei Hormone parallel mit jeder der 5 Methoden in jedem Plasma folgender Kollektive gemessen: gesunde junge Männer (20–40 Jahre alt), gesunde Frauen, Frauen unter hormoneller Kontrazeption und Frauen im 2. Trimester der Schwangerschaft. Die zonale Chromatographie war wegen ihrer hohen Präzision, die sie auch bei niedriger Steroidkonzentration und hoher Plasma-bindung zeigte, am genauesten, während das Verfahren der Gleichgewichtsdialyse mit nicht verdünntem Plasma wegen Genauigkeit und Praktikabilität Vorteile für die klinische Routine aufwies. Bei Verwendung 1:5 verdünnten Plasmas in der Gleichgewichtsdialyse war für jedes Kollektiv ein gesonderter Umrechnungsfaktor notwendig, um die freie Fraktion eines Steroids in nicht verdünntem Plasma zu berechnen. Die Genauigkeit der zentrifugalen Filtration und der Methode der graphischen Auswertung war weniger gut. Für die untersuchten Kollektive werden Normalwerte der Konzentrationen an freiem und Gesamt-Cortisol, -Testosteron und -Östradiol angegeben. Mit Hilfe der hier erstellten Regressionsgeraden ist es möglich, die mit Hilfe unterschiedlicher Verfahren erhaltenen Werte der Konzentration an freien Steroidhormonen zu vergleichen.

The measurement of free cortisol, free testosterone and free oestradiol-17 β : A comparison of five different methods

Summary: Five methods for the determination of free cortisol, testosterone and oestradiol-17 β in plasma at 37 °C are compared: equilibrium dialysis with undiluted plasma, equilibrium dialysis with 1:5 diluted plasma using a conversion factor to establish the free fraction in undiluted plasma (correlation $r:0,95$), equilibrium dialysis using graphical analysis for the establishment of the free steroid fraction in undiluted plasma ($r:0,90$), zonal chromatography ($r:0,92$) and centrifugal filtration ($r:0,80$). The concentrations of the free hormones were measured by the above 5 methods in plasma from each of the following groups: healthy young males, healthy females, females taking hormonal contraceptives and pregnant women. Zonal chromatography proved to be best suited when judged by the precision of the method. This was especially true when high binding and low plasma concentration of a steroid were present. On the other hand equilibrium dialysis with undiluted plasma was well suited for clinical purposes in both its precision and practicability. Centrifugal filtration and the method of graphical analysis of the equilibrium dialysis method were less recommendable, because of variation of the results at high binding and susceptibility to trouble. Normal values of total and free hormone concentrations of cortisol, testosterone and oestradiol are given for the collectives studied. Using the results of this investigation, it is possible to compare the values obtained by different laboratories when different methods have been used to determine the free steroid fractions of cortisol, testosterone and oestradiol.

Einleitung

Viele klinische und experimentelle Beobachtungen (1–8) sowie die Untersuchungen von Slaunwhite et al. (9) für

das Cortisol-bindende Globulin (1) und die von Mowszowicz et al. (10) für das Sexualhormone-bindende Globulin weisen darauf hin, daß an Bindungsproteine gebundene Steroidhormone für die Zelle nicht verfügbar sind (10; Übersicht: 11). Bei der Interpretation von Hormonkonzentrationen im Plasma ist deshalb zur Beurteilung der Bioverfügbarkeit von Steroidhormonen neben

¹⁾ Unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Kl 346).

²⁾ Diese Arbeit ist Teil der Dissertation von E. Bartmann.

der Angabe der Gesamtkonzentration eine zusätzliche Information über die Hormonbindung notwendig. Hierfür wurden indirekte Parameter, wie Bindungsindex (12, 13), Bindungskapazität und die Konzentration an Bindungsprotein (Übersicht: 14, 15) herangezogen. Bei der direkten Messung der freien Fraktion eines Steroidhormons aber führten verschiedene Methoden und mangelnder Konsens über die Versuchsbedingungen (16) dazu, daß die in den einzelnen Laboratorien gemessenen Werte nicht miteinander vergleichbar waren. In folgender Arbeit wurden verschiedene Verfahren zur parallelen Bestimmung der freien Steroidfraktion wie Gleichgewichtsdialyse mit nicht verdünntem Plasma (17), mit verdünntem Plasma (14, 18–20), mit graphischer Auswertung einer Verdünnungsreihe, sowie zonale Chromatographie (16) und zentrifugale Filtration (21) aus jeweils dem gleichen Plasma von Probanden verschiedener Kollektive angewendet. Mit dieser Untersuchung sollte ein methodischer Vergleich der einzelnen Verfahren durchgeführt und zusätzlich die Möglichkeit geschaffen werden, die auf verschiedene Art erhaltenen Konzentrationen für den freien Hormonanteil zu beurteilen.

Methodik

Reagenzien

[1, 2-³H]Cortisol (1,91 TBq/mmol $\hat{=}$ 51,7 Ci/mmol), [6, 7-³H]Östradiol-17 β (1,82 TBq/mmol $\hat{=}$ 49,3 Ci/mmol) und [1, 2-³H]Testosteron (1,65 TBq/mmol $\hat{=}$ 44,6 Ci/mmol) (New England Nuclear Corporation) wurden vor jedem Versuchsansatz säulenchromatographisch (Sephadex LH 20, Pharmacia Uppsala, Schweden), gereinigt. Nicht radioaktiv markierte Steroide wurden von Steraloids (Pawling, N. Y., USA) bezogen und die übrigen Chemikalien (pro analysi) von Merck, Darmstadt. Die Steroidlösungen wurden vor jedem Gebrauch neu angesetzt und bei 4 °C bis zu einer Woche gelagert.

Plasma

Gesunden, 20–40 Jahre alten Probanden (Männer, Frauen, Frauen unter hormoneller Kontrazeption, Schwangeren des 2. Trimesters) wurde zwischen 9.00 und 13.00 Uhr 50 ml Blut der Cubitalvene entnommen, dann heparinisiert und sofort zentrifugiert. Das Plasma wurde in entsprechende Portionen aufgeteilt und bis zur Aufarbeitung (gleichzeitige Messung der Fraktionen an freiem Steroid mit Hilfe 5 verschiedener Methoden) bei –20 °C gelagert. Des weiteren wurde zur Festlegung eines „Normalbereiches“ die Konzentrationen (mol/l) an Gesamt- und freiem Cortisol, Testosteron und Östradiol bei verschiedenen Kollektiven (Blutabnahme zwischen 8.00 und 9.00 Uhr) bestimmt (Abb. 6). Dabei wurde die Konzentration an Gesamthormon radioimmunologisch und die an freiem Steroid mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse mit nicht verdünntem Plasma gemessen.

Messung der Plasmakonzentrationen der Gesamthormone

Cortisol wurde radioimmunologisch unter Verwendung eines Antiserums gegen Cortisol-3-carboxy-oxim-Rinderserumalbumin bestimmt (17). Die Variation bei Messung von Tag zu Tag betrug 8,7% und 6,4% (146 \pm 12,7 und 457 \pm 29 nmol/l; n = 8) und die Empfindlichkeit 55 fmol/Ansatz. Bei Vergleich mit einer kompetitiven Proteinbindungsmethode (22) betrug die Korrelation r: 0,98 (y = 0,49 + 0,8 x; n = 66).

Testosteron (23) und **Östradiol** (24) wurden nach chromatographischer Reinigung mit Hilfe spezifischer Antikörper radioimmun-

nologisch gemessen. Die Variation von Tag zu Tag betrug 8,1% (19,2 \pm 1,6 nmol/l Testosteron; n = 10) und 13,3% (60,5 \pm 8,1 pmol/l Östradiol Plasma; n = 26) (25).

Die Konzentration an *freiem Steroid* (FS) wird aus der gemessenen Fraktion freien Steroids (FF%) und der Konzentration an Gesamthormon (GS) berechnet:

$$FS = \frac{FF\% \times GS}{100}$$

Messung des freien Steroidanteils

Im folgenden werden die einzelnen Methoden zur Messung des freien Steroidanteils bei 37 °C von Cortisol, Testosteron und Östradiol kurz dargestellt. Alle Verfahren wurden in unserem Laboratorium über einen längeren Zeitraum (2–4 Jahre) regelmäßig angewendet.

Gleichgewichtsdialyse mit nicht verdünntem Plasma (17)

1,0 ml Plasma wurde in gewaschene Cellophanschläuche (Union Carbide 8/32, Serva – Heidelberg; 180 mm lang mit bidest Wasser gewaschen, über Nacht in 0,05 mol/l Phosphatpuffer pH 7,4 belassen) eingefüllt und U-förmig in kleine Glasgefäße (Packard Zählgläschen) eingebracht. Die äußere Phase in den Glasgefäßen enthielt 10 000 Imp./min (CPM) Tritium-markiertes Steroid und 10,0 ml Phosphatpuffer (pH 7,4; 0,05 mol). Nach 16 h Inkubation im thermostatisierten Schüttelwasserbad (37 °C; 60 Schüttelbewegungen/min) wurde die Radioaktivität in 0,5 ml der inneren (Plasma) und 0,5 ml der äußeren Phase (Phosphatpuffer) gemessen (Packard 3380 mit Quench-Korrektur). Die Volumenzunahme der inneren Phase während der Dialyse wurde über die Gewichts Differenz des gefüllten, außen abgetrockneten Dialysesäckchens vor und nach Dialyse bestimmt und bei der Berechnung der Fraktion an freiem Steroid berücksichtigt (17). Die Zeichen bedeuten: CPM: Radioaktivität, gemessen in der inneren (in) und äußeren (out) Phase; Vol_{in} (out): Volumen vor Dialyse; Vol_z: Gewichtszunahme der inneren Phase, bestimmt über die Gewichts Differenz vor und nach Dialyse.

$$CPM_{corr} = CPM_{in} + \frac{CPM_{in} \times Vol_z}{Vol_{in}} - \frac{CPM_{out} \times Vol_z}{Vol_{out}}$$

$$\text{Fraktion an freiem Steroid (\%)} = \frac{CPM_{out} \times Vol_{in} \times 100}{CPM_{corr} \times Vol_{out}}$$

Gleichgewichtsdialyse mit 1:5 verdünntem Plasma

Die Durchführung der Gleichgewichtsdialyse mit 1:5 verdünntem Plasma (18) entspricht dem oben beschriebenen Verfahren mit nicht verdünntem Plasma. Bei einer Verdünnung von 1:5 (mit 0,05 mol/l Phosphatpuffer pH 7,4) tritt während der Dialyse keine Volumenzunahme der inneren Phase auf. Für jedes Kollektiv und für jedes gemessene Steroid wurden die freien Steroidfraktionen parallel in nicht verdünntem und in 1:5 verdünntem Plasma gemessen. Daraus wurde ein Umrechnungsfaktor (UF) abgeleitet, mit dessen Hilfe die mit 1:5 verdünntem Plasma gewonnenen Werte der Fraktion an freiem Steroid (F_d) auf die mit nicht verdünntem Plasma (F_u) umgerechnet wurden F_u = F_d \times UF.

Gleichgewichtsdialyse mit verdünntem Plasma zur graphischen Bestimmung der freien Steroidfraktion

Von jedem zu untersuchenden Plasma wurden Proben mit unterschiedlichen Plasmaverdünnungen (1:3, 1:5, 1:7, 1:11, 1:15 mit 0,05 mol/l Phosphatpuffer pH 7,4) der Gleichgewichtsdialyse (s. oben) zugeführt. Die Menge an radioaktiv markierter Substanz in der äußeren Phase entsprach der Verdünnung der inneren Phase. Die Bestimmung der freien Steroidfraktion in nicht verdünntem Plasma erfolgte graphisch (Abb. 1).

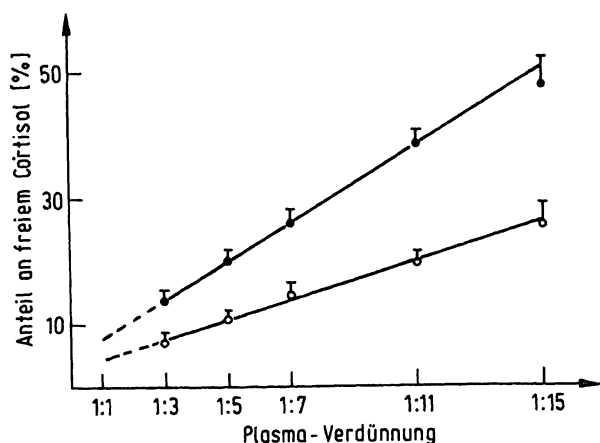


Abb. 1. Graphische Auswertung der Gleichgewichtsdialyse mit 1:3, 1:5, 1:7, 1:11 und 1:15 verdünntem Plasma für die Fraktion an freiem Cortisol (in Prozent der Gesamtmenge) bei 20–40 Jahre alten, gesunden Männern (●) und bei Frauen mit hormoneller Kontrazeption (○). Aufgetragen ist die Fraktion an freiem Cortisol in Abhängigkeit von der Plasmaverdünnung. Durch Verlängerung der so erhaltenen Geraden (gestrichelte Linie) wird die Fraktion an freiem Steroid in unverdünntem Plasma (1:1) graphisch ermittelt. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung von jeweils 10 Messungen.

Zonale Chromatographie

Bei der Methode der zonalen Chromatographie (16, 26) wird durch einen Überschuss an Plasma eine Dissoziation zwischen freier und gebundener Steroidfraktion während des Trennvorganges vermieden. Die Chromatographie (1,7 g Sephadex G-20 fine, Laufmittel: 0,05 mol/l Phosphatpuffer pH 7,4) wurde bei 37 °C durchgeführt. Eine konstante Temperatur der Säulen (200 x 10 mm) wurde über einen Kühlmantel, der mit einem thermostatisierten Wasserbad verbunden war, gewährleistet. Nach Vorwaschen der Säule mit 200 ml 0,05 mol/l Phosphatpuffer pH 7,4 wurden 10,0 ml des zu untersuchenden Plasmas, versetzt mit 20 000 Imp./min (CPM) Tritium-markierten Steroids (5 min Vorinkubation bei 45 °C, dann 30 min bei 37 °C) der Säule aufgetragen und mit 0,05 mol/l Phosphatpuffer pH 7,4 eluiert. Die Radioaktivität wurde in 0,5 ml jeder Fraktion (1,0 ml/Fraktion) im Flüssigkeitszintillationszähler mit Quenchkorrektur gemessen. Die Berechnung der Fraktion an freiem Steroid erfolgte über die Radioaktivität im niedrigen Plateau (freies Steroid: CPM_F) des Elutionsdiagramms bezogen auf die Radioaktivität im Maximum (freies und gebundenes Steroid: CPM_T) (16):

$$\text{Fraktion an freiem Steroid (\%)} = \frac{\text{CPM}_F \times 100}{\text{CPM}_T}$$

Zentrifugale Filtration

Für die zentrifugale Filtration (21, 27, 28) wurden 120 000 Imp./min (CPM) radioaktiv markierten Steroids in 2,3 ml Plasma gelöst (5 min bei 45 °C, dann 30 min bei 37 °C). Die Radioaktivität in 0,1 ml Plasma (Doppelbestimmung) diente als 100%-Wert (CPM_T). Je 1,0 ml des Plasmas wurde in mit doppelten Knoten verschlossenen Cellophananschläuche (Union Carbide 8/32; 260 mm lang, gewaschen mit 0,05 mol/l Phosphatpuffer pH 7,4) überführt. Die Schläuche wurden in U-Form in Einmalgläsern (120 x 12 mm) so eingebracht, daß der untere Rand des Schlauches den Glasboden nicht berührte. Die Schlauchenden wurden zwischen Glas und Stopfen eingeklemmt und damit fixiert. Nach Vorzentrifugation (20 min) wurden die Gläser ausgewechselt. Die dann anschließende Zentrifugation (50 min, 37 \pm 1 °C, 600 g) lieferte etwa 0,12 ml Filtrat, von dem 0,1 ml zur Messung der Radioaktivität (CPM_F) verwendet wurde. Die Fraktion an freiem Steroid wurde unter Verwendung letztgenannter Formel berechnet.

Statistische Analyse

Da bei allen 5 untersuchten Methoden die Fraktion an freiem Steroid in Prozent der Gesamtmenge gemessen wird, wurden die Fraktionen an freiem Steroid (%) (und nicht deren Plasmakonzentrationen; s. Abb. 6) unter Verwendung von Regressionskurven miteinander verglichen. Die im Text angegebenen Werte bedeuten Mittelwert \pm Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$).

Ergebnisse

Wie Tabelle 1 zeigt, war nach 11 h Dialyse ein Gleichgewicht zwischen innerer und äußerer Phase eingetreten. Bei den verdünnten Plasmen (1:5, 1:7, 1:11, 1:15) konnte nach 12 und 24 h keine Gewichtsänderung der Dialysesäckchen festgestellt werden, während bei nicht verdünntem Plasma die relative Gewichtszunahme nach 6 h Dialyse $3,4 \pm 2,1\%$, nach 10 h $4,9 \pm 4,2\%$, nach 24 h $13,2 \pm 4,7\%$ und nach 48 h $14,7 \pm 5,2\%$ (n:12) betrug.

Bei der Gegenüberstellung der Werte für die Menge an dialysierbarem Steroidhormon, gemessen mit 1:5 verdünntem und mit nicht verdünntem Plasma, war ein Umrechnungsfaktor ableitbar, mit dessen Hilfe die freie Fraktion in nicht verdünntem Plasma aus den mit 1:5 verdünntem Plasma gewonnenen Werten berechnet werden konnte. Dieser Umrechnungsfaktor (UF) wies je nach Steroid und je nach untersuchtem Kollektiv Unterschiede auf. Er betrug bei gesunden jungen Männern für Cortisol (F), Testosteron (T) und Östradiol (E): UF_F: 0,342 (n: 35), UF_T: 0,340 (n: 20) und UF_E: 0,290 (n: 20), bei jungen gesunden Frauen: UF_F: 0,345 (n: 35), UF_T: 0,346 (n: 20) und UF_E: 0,394 (n: 20) und bei Frauen unter hormoneller Kontrazeption: UF_F: 0,404 (n: 30), UF_T: 0,394 (n: 20) und UF_E: 0,501 (n: 20).

Bei Aufstellen von Verdünnungsreihen mit Plasma bestand bis zu einer Verdünnung von 1:15 eine lineare Abhängigkeit zwischen Verdünnung und dialysierbarem Steroid, so daß eine graphische Bestimmung des freien Steroidanteils in nichtverdünntem Plasma möglich war (Abb. 1).

Im Gegensatz zu der Originalmethode (16) wurde bei der zonalen Chromatographie eine dünnere Säule verwendet. Dadurch konnte bei gleichartigen Trenneigenschaften die erforderliche Plasmamenge von 25,0 auf 10,0 ml reduziert werden. Eine weitere Reduktion von Säulenlänge, Säulendurchmesser oder Plasmamenge ergab keine zufriedenstellende Trennung.

Tab. 1. Einfluß der Dialysendauer auf die Fraktionen an freiem (= dialysierbarem) Cortisol, Testosteron und Östradiol. Die Gleichgewichtsdialyse erfolgte bei 37 °C mit nicht verdünntem „Poolplasma“. Angegeben sind die Mittelwerte von jeweils 6 Einzelbestimmungen.

Anteil an freiem	Dauer der Gleichgewichtsdialyse (h)				
	6	11	22	46	72
Cortisol [%]	11,6	7,6	7,5	7,6	7,8
Testosteron [%]	6,0	2,7	2,5	2,5	2,7
Östradiol [%]	3,9	2,4	2,3	2,4	2,6

Bei der Verwendung der zentrifugalen Filtration konnte bei 12 Untersuchungen kein Eiweiß im Ultrafiltrat nachgewiesen werden. Im Laufe einer 2½ h Zentrifugation und der Gewinnung von insgesamt 0,24 ml Filtrat aus 1,0 ml Plasma blieb die Radioaktivität/Volumeneinheit (0,01 ml Filtrat) nach der Vorzentrifugation konstant.

Vergleicht man die hier an einer Plasmaprobe mit jeweils 5 verschiedenen Bestimmungsverfahren gemessene Fraktion an freiem Steroid (Abb. 2–5), so fallen folgende Besonderheiten und Differenzen auf. Die 3 Verfahren unter Verwendung der Gleichgewichtsdialyse (Abb. 2, 3) ermittelten praktisch identische Werte für das freie Steroidhormon, wobei die graphische Bestimmungsmethode jedoch in ihrer Genauigkeit (Tab. 2) schlechter abschnitt. Am weitesten wichen die Werte der zentrifugalen Filtration ab und hier besonders diejenigen der Hormone mit hoher Plasmabindung. Obwohl die zonale Chromatographie (Abb. 4) in allen Meßbereichen niedrigere Werte für die freie Steroidfraktion lieferte, waren ihre Ergebnisse gut mit denen der Gleichgewichtsdialyse vergleichbar ($r: 0,92–0,94$). Bei der Beurteilung der Genauigkeit in der Messung des freien Steroidanteils der 3 Hormone (Tab. 2) war die zonale Chromatographie sowohl für die Variation in einem Meßansatz als auch bei Messung von Tag zu Tag am günstigsten, gefolgt von der Gleichgewichtsdialyse mit nicht verdünntem Plasma. Die zentrifugale Filtration (Abb. 5) und die graphische Auswertung (Abb. 3) der Gleichgewichtsdialyse waren weniger genau. Die Praktikabilität der Methode der zonalen Chromatographie war jedoch bedeutend geringer als die der anderen Verfahren, besonders dann, wenn man die große dazu notwendige Plasmamenge berücksichtigt.

Diskussion

Eine Reihe von Pharmaka und Erkrankungen bedingen eine Änderung der Konzentrationen spezifisch bindender Plasmaproteine (4, 6–8, 15, 20, 29–34). Aus diesem Grunde ist die alleinige Messung der Konzentrationen an Gesamtsteroiden in vielen Fällen nicht ausreichend. Indirekte (12, 13, 15) wie direkte Verfahren (16–18, 21) sind zur Bestimmung der Hormonbindung bekannt, ohne daß es jedoch bisher möglich gewesen wäre, die Meßdaten verschiedener Laboratorien bezüglich der Bindung von Steroidhormonen miteinander vergleichen zu können. Mit dieser Arbeit sollte ein Methodenvergleich verschiedener Verfahren zur Messung des freien Steroidanteils (bei 37 °C) durchgeführt werden und zusätzlich ein Ansatz für einen Vergleich der Daten aus verschiedenen Laboratorien geschaffen werden.

Da für die Messung des freien Steroidanteils im Plasma keine Referenzmethoden zur Verfügung stehen und theoretisch jedes bisher bekannte Verfahren methodische Fehlermöglichkeiten aufweist, mußten die hier beschriebenen Verfahren miteinander verglichen werden. Es muß betont werden, daß in-vitro Untersuchungen über die

Bindung von Steroiden im Plasma nicht unbedingt in-vivo Bedingungen wiedergeben. Es besteht jedoch der Konsens, daß durch in-vitro Versuche erlangte Ergebnisse die in-vivo Verhältnisse widerspiegeln (18). In dieser Arbeit wurde eine Differenzierung der Bindung an verschiedene

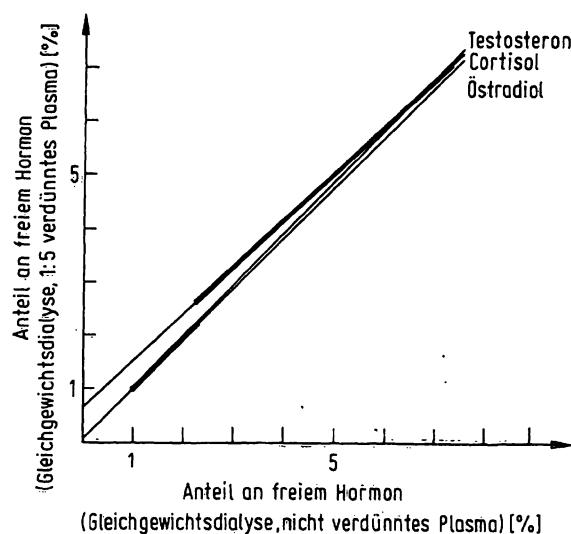


Abb. 2. Korrelation der mit 2 verschiedenen Verfahren gewonnenen Werte für die Fraktionen an freiem Cortisol, freiem Testosteron und freiem Östradiol bei gesunden Probanden. Verglichen werden die Gleichgewichtsdialyse mit nicht verdünntem Plasma (Abszisse) mit der Gleichgewichtsdialyse unter Verwendung 1:5 verdünnten Plasmas (unter Verwendung der im Text angegebenen Umrechnungsfaktoren). Die breit gezeichneten Striche geben den jeweiligen gemessenen Bereich an freiem Steroid an. Die Regressionsgleichungen für die 3 untersuchten Steroide lauten: freies Cortisol: $y = 0,67 + 0,88x$ ($r: 0,95$; $n = 45$), freies Testosteron: $y = 0,05 + 0,98x$ ($r: 0,99$; $n = 18$), freies Östradiol: $y = 0,04 + 0,98x$ ($r: 0,98$; $n = 18$).

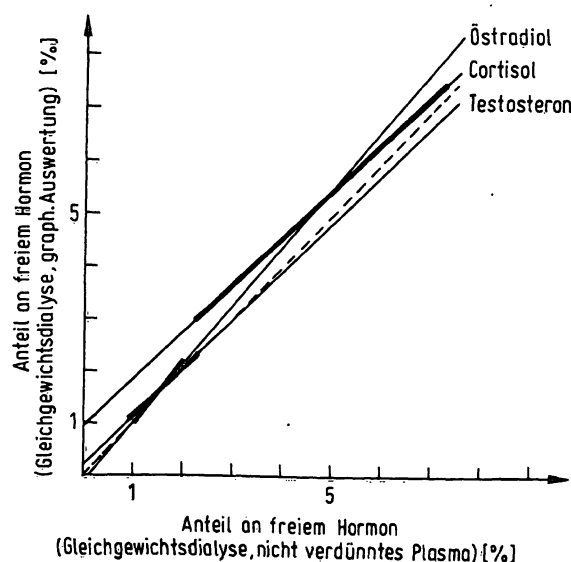


Abb. 3. Vergleich der Gleichgewichtsdialyse mit nicht verdünntem Plasma mit der mit 1:3, 1:5, 1:7, 1:11 und 1:15 verdünntem Plasma bei graphischer Auswertung (Abb. 1). Die Regressionsgleichungen lauten für freies Cortisol: $y = 0,96 + 0,90x$ ($r: 0,90$; $n = 45$), für freies Testosteron: $y = 0,18 + 0,93x$ ($r: 0,92$; $n = 18$) und für freies Östradiol: $y = -0,07 + 1,11x$ ($r: 0,87$; $n = 18$). S. auch Legende zu Abb. 2.

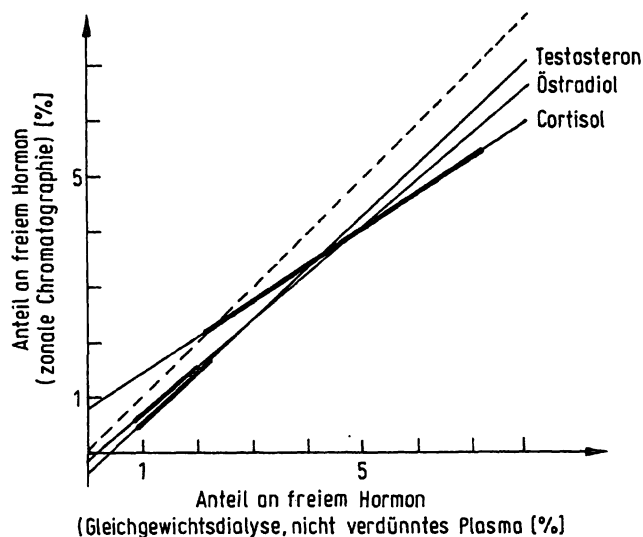


Abb. 4. Vergleich der gemessenen Fraktionen an freiem Steroid mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse mit nicht verdünntem Plasma mit denen die durch die zonale Chromatographie gewonnen wurden. Die Regressionsgleichungen sind: für Cortisol: $y = 0,80 + 0,66 x$ ($r: 0,92$; $n = 45$), für Testosteron: $y = -0,42 + 0,95 x$ ($r: 0,97$; $n = 18$) und für Östradiol: $y = -0,17 + 0,86 x$ ($r: 0,95$; $n = 18$). Für weitere Erläuterungen s. Abb. 2.

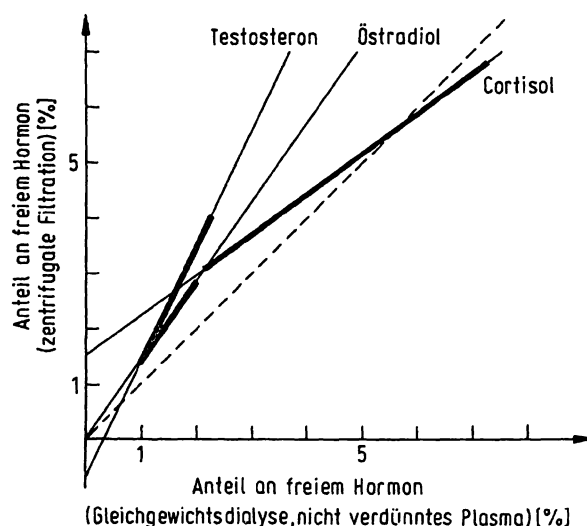


Abb. 5. Regressionskurven für den Vergleich der Fraktionen an freiem Cortisol, freiem Testosteron und freiem Östradiol, gewonnen durch die Gleichgewichtsdialyse mit nicht verdünntem Plasma und mit Hilfe der zentrifugalen Filtration. Die Gleichungen sind: für freies Cortisol: $y = 1,52 + 0,73 x$ ($r: 0,80$; $n = 45$), für freies Testosteron: $y = -0,73 + 2,10 x$ ($r: 0,91$; $n = 18$) und für freies Östradiol: $y = 0,01 + 1,42 x$ ($r: 0,86$; $n = 18$). S. auch Legende zu Abb. 2.

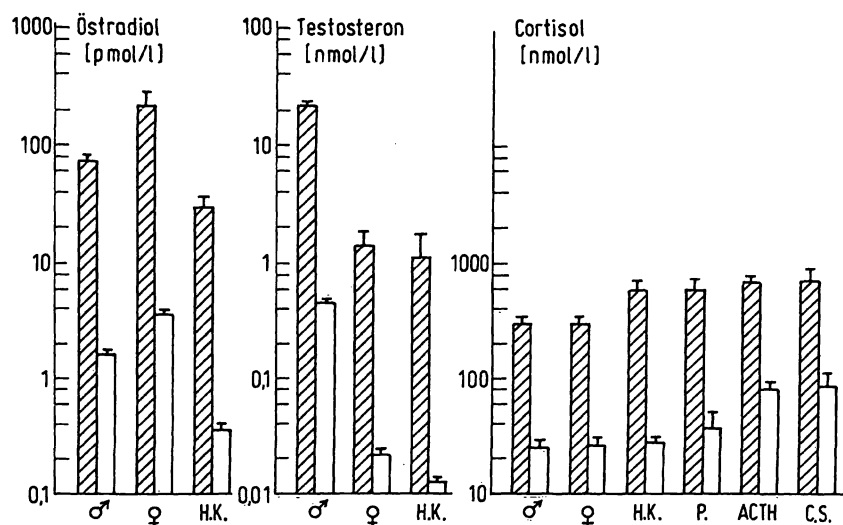


Abb. 6. Konzentrationen an Gesamt- (hatched bars) und freiem (white bars) Cortisol, Testosteron und Östradiol bei verschiedenen Kollektiven gesunder Probanden (20–40 Jahre alt; Blutabnahme zwischen 8.00 und 9.00 Uhr). Die Zeichen bedeuten: ♂: Männer ($n = 18$); ♀: Frauen ($n = 18$); H. K.: Frauen mit hormoneller Kontrazeption ($n = 15$); P: Frauen im 2. Trimester der Schwangerschaft ($n = 20$); ACTH: männliche Probanden nach Corticotropin Stimulation (0,25 mg Synacthen CIBA i. v., Blutabnahme nach 60 min); C. S.: Patienten mit hypothalamischem Cushing-Syndrom ($n = 20$).

Bindungsproteine im Plasma nicht durchgeführt, da die biologische Bedeutung der verschiedenen Bindungsproteine nicht sicher ist und ein solches Unternehmen auch den in-vivo Bedingungen nicht gerecht wird.

Mit Hilfe der hier beschriebenen Verfahren konnten nicht nur die Konzentrationen der freien Hormone hoher Konzentration und relativ geringer Bindung im Plasma (wie z. B. Cortisol), sondern auch die von Testosteron und

Östradiol gemessen werden, deren Bindung an Plasmaproteine relativ hoch (35) und deren Konzentration im Plasma gering ist (Verhältnis der Plasmakonzentrationen an Gesamthormon beim Mann von Cortisol: Testosteron: Östradiol wie 5000:250:1).

Ein Beispiel für den praktischen Nutzen der Messung des freien verfügbaren Hormonanteils zeigt Abbildung 6, wo nur die Menge an freiem Cortisol eine Differenzierung

Tab. 2. Präzision, Wiederfindung und Praktikabilität bei der Messung der Fraktion an freiem Cortisol, freiem Testosteron und freiem Östradiol (in Prozent der Gesamtmenge) für 5 verschiedene Methoden. Die Werte sind mit Hilfe eines „Poolplasmas“ gewonnen worden. $\bar{x} \pm s$: Mittelwert \pm Standardabweichung, VK: Variationskoeffizient.

		Gleichgewichtsdi- lyse (nicht verdünntes Plasma)		Gleichgewichtsdi- lyse (1:5 verdünntes Plasma)		Gleichgewichtsdi- lyse (graph. Auswer- tung)		Zonale Chromato- graphie		Zentrifu- gale Filtration	
	n	$\bar{x} \pm s$	VK	$\bar{x} \pm s$	VK	$\bar{x} \pm s$	VK	$\bar{x} \pm s$	VK	$\bar{x} \pm s$	VK
Präzision											
<i>Intra-assay</i>											
Cortisol, freier Anteil [%]	7	6,56 \pm 0,39	6,0	6,60 \pm 0,45	6,2	6,10 \pm 0,78	12,8	5,60 \pm 0,14	2,5	5,82 \pm 0,22	3,8
Testosteron, freier Anteil [%]	6	1,62 \pm 0,13	8,1	1,63 \pm 0,15	9,2	1,73 \pm 0,20	11,5	0,84 \pm 0,05	4,2	2,35 \pm 0,21	9,0
Östradiol, freier Anteil [%]	6	2,46 \pm 0,15	6,1	2,52 \pm 0,16	6,3	1,98 \pm 0,18	9,1	1,40 \pm 0,06	4,3	1,51 \pm 0,11	7,3
<i>Inter-assay</i>											
Cortisol, freier Anteil [%]	10	6,77 \pm 0,61	9,0	6,79 \pm 0,65	9,6	6,24 \pm 0,91	14,6	5,76 \pm 0,45	7,8	6,05 \pm 0,59	9,8
Testosteron, freier Anteil [%]	6	1,61 \pm 0,16	9,9	1,61 \pm 0,16	10,0	1,60 \pm 0,18	11,3	0,86 \pm 0,06	7,0	2,37 \pm 0,25	10,5
Östradiol, freier Anteil [%]	6	2,73 \pm 0,23	8,4	2,73 \pm 0,21	7,7	1,98 \pm 0,19	9,6	1,44 \pm 0,11	7,5	1,56 \pm 0,15	9,6
Wiederfindung (Tracer)	20	98,6 \pm 2,4		98,9 \pm 2,6		—		96,9 \pm 3,0		97,4 \pm 4,2	
Praktikabilität											
Proben/Mitarb./Tag (etwa)		100		100		20		14		100	
Plasma [ml]		1,0		0,2		0,9		10,5		1,3	

ermöglichte zwischen erhöhten Cortisolwerten nach Corticotropin-Stimulation beim hypothalamischen Cushing-Syndrom und solchen nach Erhöhung der Konzentration an Bindungsprotein (z. B. durch Östrogenhaltige hormonelle Kontrazeptiva oder Schwangerschaft).

Die Konzentrationen an freiem Testosteron (Abb. 6) entsprachen denen, die von Vermeulen et al. (19) und Chopra et al. (20) beschrieben wurden, lagen jedoch etwas höher als die von Forest et al. (36) und Rivarola et al. (30). Alle Autoren verwendeten die Gleichgewichtsdialyse mit verdünntem Plasma. Die Umrechnung auf den freien Steroidanteil erfolgte bei Forest (30, 36) mit Hilfe eines nicht näher definierten und bei Chopra et al. (20, 32) unter Verwendung eines für alle Kollektive einheitlichen Umrechnungsfaktor. Das gleiche gilt für das freie Östradiol, für das bei verschiedenen Untersuchungen unterschiedliche „Normalwerte“ mitgeteilt wurden (20, 32). Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, daß für jedes untersuchte Kollektiv ein eigener Umrechnungsfaktor verwendet werden muß, um zu den Werten in nicht verdünntem Plasma zu gelangen. Dieser Umrechnungsfaktor wies keine Korrelation zu den Konzentrationen von Albumin oder den elektrophoretisch getrennten Eiweißfraktionen auf.

Im Gegensatz zu den Befunden von Baumann et al. (13) trat während der Gleichgewichtsdialyse mit nicht verdünntem Plasma eine Volumenzunahme der inneren Phase (Plasma) auf (19, 20). Diese Volumenzunahme unterlag von Probe zu Probe großen Schwankungen (3–20%; \bar{x} : 12,8 \pm 5,2%; n = 300), die nicht durch unterschied-

liche Albuminkonzentrationen bedingt waren. Aufgrund dessen war es notwendig, die Volumenzunahme für jede Probe individuell zu bestimmen. Ein einheitlicher Verdünnungsfaktor, wie von Chopra et al. (20, 32) angewendet, konnte deshalb nicht gebraucht werden. Durch die Verdünnung der inneren Phase kann es theoretisch zu Veränderungen des Gleichgewichts zwischen Steroidhormon und Bindungsprotein kommen, die nicht durch die Gewichtsunterschiede berücksichtigt werden können. Dies gilt besonders bei Verwendung von 1:5 verdünntem Plasma, wie es in vielen Laboratorien üblich ist (14, 19, 20, 36, 37). Mathematische (19) oder graphische Rückschlüsse von den Werten in verdünntem Plasma auf die Bindungsverhältnisse in nicht verdünntem Plasma sind damit immer problematisch. Die Überlegungen, die für die Methode der Gleichgewichtsdialyse mit nicht verdünntem Plasma gemacht wurden, sind, wenn auch mit umgekehrtem Vorzeichen, für die zentrifugale Filtration gültig. Auch hier kann durch die Volumenänderung (Abfiltrieren proteinfreier Flüssigkeit; etwa 0,12 ml von 1,0 ml Plasma) eine Änderung der Bindungsverhältnisse eintreten, die für die relativ großen Schwankungen dieser Methode bei allen gemessenen Steroidhormonen verantwortlich gemacht werden könnte. Da die zonale Chromatographie über den gesamten Konzentrations- und Bindungsbereich aller gemessenen Steroidhormone die niedrigsten Werte für den freien Hormonanteil ergab, stellte sich die Frage, ob während der Gleichgewichtsdialyse und der zentrifugalen Filtration eine Dissoziation des gebundenen Steroids eintrat. Bei 37 °C kann sich nämlich innerhalb weniger

Sekunden ein Gleichgewicht neu einstellen (38). Gegen eine solche Annahme sprach das Ergebnis eines Zusatzversuches, in dem selbst nach 72 h Dialyse noch gleich große Fraktionen an freiem Steroid wie nach 11 h gemessen wurden (Tab. 1).

Ein Fehler, der bei allen Verfahren mit nicht verdünntem Plasma und sich besonders bei hoher Bindung auswirkt, ist die mangelnde Reinheit Tritium-markierter Steroidhormone. Da diese käuflichen Substanzen nur einen Reinheitsgrad von 96–99% hatten, stellten 1–4% degradiertes Steroid eine Fehlermöglichkeit dar. Dieser Fehler konnte, da die Bindung der degradierten Substanzen nicht bekannt ist, nicht berücksichtigt werden. Durch chromatographische Reinigung des „Tracers“ vor jedem Versuch wurde oben genannter Fehler reduziert, jedoch nicht eliminiert (20, 32). Dieser Fehler war umso größer, je höher die Bindung eines Steroids an Plasmaproteine war, so daß hier ein Vorteil für die Bestimmung der Bindung in 1:5 verdünntem Plasma zu sehen war (19). Verfahren zur Bestimmung der Steroidbindung bei niedrigeren Temperaturen als 37 °C (21) betrachten wir als ungünstig, da der Meßfehler aller Methoden bei höherer Steroidbindung größer wird (Tab. 2), und diese Temperaturen den physiologischen Bedingungen nicht gerecht werden.

Die zonale Chromatographie (16) lieferte neben dem Vorteil der großen Genauigkeit (Tab. 2) die niedrigsten und damit besten Werte, da alle bisher bekannten Fehler zu falsch hohen Werten für den freien Steroidanteil führten. Dagegen stand als erheblicher Nachteil die erforderliche

Plasamenge von etwa 10 ml. Für die klinische Routine, besonders dann, wenn die freie Fraktion mehrerer Steroidhormone gemessen werden soll, sind 10 ml aber eine meist zu große Plasamenge.

Bei der Beurteilung der gewonnenen Zuverlässigkeitskriterien, der Praktikabilität und bei dem Vergleich der Ergebnisse für die Messung des freien Steroidanteils von Testosteron, Östradiol und Cortisol sind die Verfahren der zonalen Chromatographie und der Gleichgewichtsdialyse mit nicht verdünntem Plasma günstiger als die anderen hier beschriebenen Methoden. Solange keine echte Referenzmethode zur Verfügung steht, ist die zonale Chromatographie zur Beurteilung anderer Verfahren geeignet. Dies gilt vornehmlich bei hoher Bindung und niedriger Steroidkonzentration. Dagegen hat die Gleichgewichtsdialyse wegen ihrer Genauigkeit und Praktikabilität (Tab. 2) besondere Bedeutung in der klinischen Routine. Die Regressionsgeraden (Abb. 2–5) der einzelnen Verfahren ermöglichen es, die durch verschiedene Methoden gewonnenen Werte für die Fraktion an freiem Steroid miteinander zu vergleichen.

Danksagung

Unseren Mitarbeiterinnen Frau B. Solimann, Frau M. Pier und Frä. I. Kloidt sind wir wegen ihrer wertvollen technischen Assistenz zu Dank verpflichtet. Herrn Dr. F. Bidlingmaier, München und Herrn Prof. Dr. E. Nieschlag, Münster, danken wir wegen Überlassung von spezifischen Antisera gegen Östradiol und Testosteron.

Literatur

- Robertson, M. E., Stiefel, M. & Laidlaw, J. C. (1959), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 19, 1381–1398.
- Mills, I. H., Schedl, H. P., Chen, P. S. & Bartter, F. C. (1960), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 20, 515–528.
- Peterson, R. E., Nokes, G., Chen, P. S. & Black, R. I. (1960), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 20, 495–515.
- Matsui, N., Plager, J. E. (1966), *Endocrinology* 78, 1159–1164.
- Demisch, K., Grant, J. K. & Black, W. (1968), *J. Endocrinol.* 42, 477–481.
- Rosenthal, H. E., Slaunwhite, W. R. jr. & Sandberg, A. A. (1969), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 29, 352–367.
- Lasnitski, I. & Franklin, H. R. (1972), *J. Endocrinol.* 54, 333–342.
- Raynaud, J.-P. (1973), *Steroids* 21, 249–258.
- Slaunwhite, W. R., Lockie, G. N., Back, N. & Sandberg, A. A. (1962), *Science* 135, 1062–1063.
- Mowszowicz, I., Kahn, D. & Dray, F. (1970), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 31, 584–586.
- Burton, R. M. & Westphal, U. (1972), *Metabolism* 21, 253–276.
- Heyns, W., van Baelen, H. & de Moor, P. (1967), *Clin. Chim. Acta* 18, 361–370.
- Baumann, G., Rappaport, G., Lemarchand-Beraud, T. & Felber, J.-P. (1975), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 40, 462–469.
- Westphal, U. (1971), *Steroid-protein interactions*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Anderson, D. C. (1974), *Clin. Endocrinol.* 3, 69–96.
- Burke, C. W. (1969), *Biochim. Biophys. Acta* 176, 403–413.
- Kley, H. K., Bartmann, E. & Krüskemper, H. L. (1977), *Acta Endocrinol. (Kbh.)* 85, 209–219.
- Forest, M. G., Rivarola, M. A. & Migeon, C. J. (1968), *Steroids* 12, 323–343.
- Vermeulen, A., Stoica, T. & Verdonck, L. (1971), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33, 759–767.
- Chopra, I. J., Tulchinsky, D. & Greenway, F. L. (1973), *Ann. Int. Med.* 79, 198–203.
- Chen, P. S., Mills, I. J. & Bartter, F. C. (1961), *J. Endocrinol.* 23, 129–137.
- Kley, H. K. & Krüskemper, H. L. (1971), *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 9, 520–526.
- Nieschlag, E. & Loriaux, D. L. (1972), *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 10, 164–168.
- Bidlingmaier, F., Wagner-Barnack, M., Butenandt, O. & Knorr, D. (1973), *Pediat. Res.* 7, 901–907.
- Kley, H. K. (1975), *Östrogene im Plasma des Mannes*, Urban & Schwarzenberg, München.
- De Moor, P., Heirwegh, K., Heremans, J. F. & Declerck-Raskin, M. (1962), *J. Clin. Invest.* 41, 816–821.
- Doe, R. P., Fernandez, R. & Seal, U. S. (1964), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 24, 1029–1039.
- Plager, J. E., Schmidt, K. G. & Staubitz, W. J. (1964), *J. Clin. Invest.* 43, 1066–1072.
- Doe, R. P., Mellinger, G. T., Swaim, W. R. & Seal, U. S. (1967), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 27, 1081–1086.
- Rivarola, M. A., Forest, M. G. & Migeon, C. J. (1968), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 28, 34–40.
- Keane, P. M., Pearson, J. & Walker, W. H. C. (1969), *J. Endocrinol.* 43, 571–579.
- Chopra, I. J., Abraham, G. E., Chopra, U., Solomon, D. H. & Odell, W. D. (1972), *New Engl. J. Med.* 286, 124–129.
- Kley, H. K., Herrmann, J., Morgner, K. D. & Krüskemper, H. L. (1973), *Horm. Metab. Res.* 5, 271–274.

34. Kley, H. K., Nieschlag, E., Wiegelmann, W., Solbach, H. G. & Krüskemper, H. L. (1975), *Acta Endocrinol. (Kbh.)* 79, 275–285.
35. Vermeulen, A. & Verdonck, L. (1968), *Steroids* 11, 609–635.
36. Forest, M. G., Cathiard, A. M. & Bertrand, J. A. (1973), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36, 1132–1142.
37. Forest, M. G., Ances, I. G., Tapper, A. J. & Migeon, C. J. (1971), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 32, 417–425.
38. Dixon, P. F. (1968), *J. Endocrinol.* 40, 457–465.

Anschrift der Verfasser:
Priv. Doz. Dr. H. K. Kley,
E. Bartmann,
Prof. Dr. H. L. Krüskemper
2. Medizinische Klinik und Poliklinik
der Universität Düsseldorf
Moorenstraße 5
D-4000 Düsseldorf